

Mendelova univerzita v Brně

Zahradnická fakulta v Lednici

Vznik vyšších alkoholů ve víně

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce:

Ing. Michal Kumšta

Vypracoval:

Martin Štefanov

Lednice 2016



ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Martin Štefanov**
Studijní program: Zahradnické inženýrství
Obor: Vinohradnictví a vinařství
Název tématu: **Vznik vyšších alkoholů ve víně**
Rozsah práce: 40 stran textu, tabulek, grafů a schémat

Zásady pro vypracování:

1. Prostudujte literaturu týkající se alkoholů vznikajících v průběhu fermentace a jejich esterů ve víně.
2. Popište, jakým způsobem tyto látky vznikají, podmínky ovlivňující jejich celkovou produkci a vliv na kvalitu vína. Uveďte hlavní zástupce.
3. Uveďte metody stanovení těchto látek a jejich koncentrace ve víně.

Seznam odborné literatury:

1. RIBÉREAU-GAYON, P. – BRANCO, J M. Handbook of enology. : The microbiology of wine and vinifications. volume 1. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103651, 97804700103411. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010363>.
2. BRANCO, J M. – RIBÉREAU-GAYON, P. Handbook of enology. : The chemistry of wine stabilization and treatments. volume 2. Chichester, West Sussex, England. 2006. ISBN 97804700103962, 97804700103722. URL: <http://dx.doi.org/10.1002/0470010398>.
3. POLO, C M. – MORENO-ARRIBAS, V M. *Wine chemistry and biochemistry*. 1. vyd. New York: Springer, 2008. 735 s. ISBN 978-0-387-74116-1.

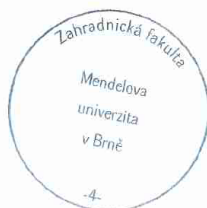
Datum zadání bakalářské práce: prosinec 2014

Termín odevzdání bakalářské práce: květen 2016



Martin Štefanov
Autor práce

L. S.



Ing. Michal Kumšta
Vedoucí práce



doc. Ing. Mojmír Baroň, Ph.D.
Vedoucí ústavu



prof. Ing. Robert Pokluda, Ph.D.
Děkan ZF MENDELU

Prohlašuji, že jsem práci: Vznik vyšších alkoholů ve víně

vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Lednici dne:

.....

podpis

Děkuji svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Michalovi Kumštovi za rady, připomínky a doporučení, které mi při vypracovávání bakalářské práce poskytoval.

Obsah

1	Úvod	7
2	Cíl práce.....	8
3	Alkoholy	9
3.1	Dělení alkoholů	9
3.2	Nižší alkoholy ve víně – metanol, etanol	11
3.2.1	Metanol	11
3.2.2	Etanol	11
4	Vyšší alkoholy	13
5	Vznik vyšších alkoholů	15
5.1	Ehrlichovy reakce.....	17
5.1.1	Transport aminokyseliny do buňky	17
5.1.2	Transaminační krok Ehrlichovy reakce	18
5.1.3	Dekarboxylační krok Ehrlichovy reakce	20
5.1.4	Redukční a oxidační krok Ehrlichovy reakce	22
5.1.5	Úlohy Ehrlichových reakcí	24
5.2	Biosyntéza aminokyselin	25
5.2.1	Biosyntéza aromatických aminokyselin	27
5.3	Vyloučení vyšších alkoholů a kyselin z buňky	31
5.4	Faktory ovlivňující vznik vyšších alkoholů	32
6	Metody stanovení vyšších alkoholů ve víně.....	36
6.1	Plynová chromatografie – GLC	37
7	Shrnutí	40
8	Závěr.....	42
9	Seznam použité literatury	44

1 Úvod

Víno je nejrozšířenější alkoholický nápoj na světě. Vyskytuje se v podstatě na všech kontinentech a dovolím si říci, že je to také nejoblíbenější alkoholický nápoj. Jeho konzumace se vyznačuje snad až přehnanou úctou a dění kolem je vždy vyplněno spoustou informací, které často popisují, jak víno vznikalo, co za problémy se vyskytlo, ale jak se nakonec vše dobře podařilo.

Proč tomu tak je, na to je těžké odpovědět. Osobně si myslím, že je to díky obrovské variabilitě vína, která je ovlivňována téměř vším, co se při výrobě vína naskytne. Ať je to již proces vinohradnictví, kdy nezáleží pouze na jednotlivých parametrech, jež základními jsou odrůda, vinice, ročník, ale také na jejich kombinaci a umění vinohradníka. Následuje práce enologů ve sklepích a moderních halách, kteří se snaží balancovat mezi křehkou hranicí fungování těch správných mikroorganismů mezi těmi pro víno nevhodnými. Musí dodržovat správné technologické postupy a již počátkem roku přemýšlet, jestli zvolit pro to či ono víno technologii moderní, nebo se vydají tradiční cestou.

Z chemického hlediska je víno kyselý roztok vody a alkoholu s případným zbytkovým cukrem – u vína nejčastěji fruktózou. Tyto čtyři složky tvoří až 95% objemu vína a jsou tedy naprosto zásadní. Zbýlá procenta jsou různě rozmělněna mezi více než tisíc látek a jejich procentuální zastoupení je tedy na první pohled velmi malé. O co nižší zastoupení, o to často vyšší důležitost v celkovém vyznění vína. Jako příklad mohou sloužit látky 4–Etylfenol a 4–Etylguajakol, které vznikají metabolismem kvasinek *Brettanomyces bruxellensis* a ty v množství 0,4 mg.l⁻¹ respektive 0,07 mg.l⁻¹ vytváří nepříjemný zápach po koňském sedle, stáji nebo uzeném mase (Eder R., 2006).

Téma této práce se týká vzniku vyšších alkoholů ve víně. V práci tedy budou popsány nejznámější a zřejmě nejzásadnější vyšší alkoholy ve víně. Hlavní částí práce bude popis procesů jejich vzniku, případně jejich další chemické proměny. Budou uvedeny také metody stanovení těchto látek a jejich koncentrace ve víně.

2 Cíl práce

Cílem této práce je shromáždit a prozkoumat literaturu týkající se vyšších alkoholů – jejich hlavní zástupce, důraz bude kladen na mechanismus vzniku vyšších alkoholů, faktory ovlivňující proces tvorby a vliv těchto látek na výsledný produkt.

3 Alkoholy

Z chemického hlediska jsou alkoholy organické sloučeniny ze skupiny hydroxyderivátů. Deriváty uhlovodíků, které vznikají náhradou jednoho či více atomů vodíku na atomu uhlíku nearomatického uhlovodíku hydroxylovou skupinou (-O-H).

Alkoholy jsou hojně rozšířeny v přírodě. Vyskytují se zejména ve formě esterů (tuky, vosky, pryskyřice, ...). Alkoholy se získávají nejrůznějšími způsoby. Patří mezi ně fermentační procesy, hydrogenace esterů, fenolů a různých derivátů karboxylových kyselin, redukcí karbonylových sloučenin, hydrolýzou halogen derivátů. V chemickém průmyslu se alkoholy používají jako rozpouštědla pro přípravu esterů, různých produktů umělých hmot, výbušnin, výrobu léčiv, v potravinářství. (Velíšek J. 2009)

Spousta alkoholů patří mezi jedovaté látky. Příkladem jsou již dva nejjednodušší alkoholy etanol a metanol, kdy první v menším množství navozuje pocit bezstarostnosti, otupuje mysl a vyvolává euforii. Po požití etanolu nastává zpomalení vnímání a osoba pod vlivem se může dopouštět chybných úsudků (řízení dopravního prostředku, ...). Metanol může být smrtelně jedovatý již při požití 10 ml. Důvodem jsou metabolity jeho přeměny v těle, kdy je nejprve enzymem alkohol dehydrogenázou vytvářen formaldehyd, který je následně enzymy přeměněn na kyselinu mravenčí. Tedy metanol není sám o sobě příliš jedovatý, ale jedovaté jsou jeho metabolity.

3.1 Dělení alkoholů

Alkoholy můžeme dělit podle několika systémů. Mezi hlavní patří: podle počtu vázaných hydroxylových skupin, z hlediska druhu radikálu, dle typu uhlovodíkového zbytku, na který je navázána hydroxylová skupina. (Velíšek J. 2009)

Alkoholy rozdělené podle počtu vázaných hydroxylových skupin:

- Alkoholy (jednosytné) – obsahují jednu hydroxylovou skupinu -OH. Patří sem např. metanol, etanol, propanol
- Dioly (dvojsytné) – obsahují dvě hydroxylové skupiny -OH, patří sem např.: 1,2-ethandiol (etylenglykol), 1,4-butandiol
- Trioly (trojsytné) obsahují tři hydroxylové sloučeniny -OH, patří sem např. propan-1,2,3-triol (glycerol)
- Tetraoly (čtyřsytné) – obsahují čtyři hydroxylové skupiny -OH, patří sem např. (2*R*,3*S*)-butan-1,2,3,4-tetraol (Erythritol)

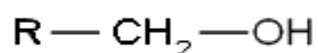
- Pentaoly, Hexaoly, Heptaoly atd.

Rozdělení dle uhlovodíkového zbytku, na který je navázána hydroxylová skupina:

- Acyklické alkoholy – hydroxylová skupina je vázána k atomu uhlíku necyklického uhlovodíkového zbytku
- Alicyklické alkoholy – hydroxylová skupina je vázána k atomu uhlíku cyklického uhlovodíkového zbytku.

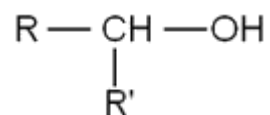
Rozdělení z hlediska druhu radikálu, který vznikne odtržením radikálu -OH z molekuly alkoholu:

- Primární alkoholy – jedná se o primární radikál – na uhlík s navázanou hydroxylovou skupinou jsou navázány dva uhlíky (u metanolu, 3 vodíky).



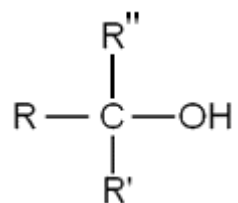
Obr. 1 Strukturální vzorec primárního alkoholu. (<https://cs.wikipedia.org>)

- Sekundární alkoholy – vzniká sekundární radikál – na uhlík s hydroxylovou skupinou je navázán jeden vodík.



Obr. 2 Strukturální vzorec sekundárního alkoholu (<https://cs.wikipedia.org>)

- Terciální alkoholy – vzniká terciální radikál – na uhlík s hydroxylovou skupinou není navázán žádný vodík.



Obr. 3 Strukturální vzorec terciálního alkoholu (<https://cs.wikipedia.org>)

3.2 Nižší alkoholy ve víně – metanol, etanol

Tématem této práce jsou vyšší alkoholy, ale pro ucelený pohled na alkoholy si dovolím zmínit i základní alifatické alkoholy. Jedná se o metanol, tedy základní alkohol s jedním uhlíkem v molekule, který má pro víno význam z hlediska toxicity svých metabolitů, a etanol, který je pro víno naprosto podstatný – je totiž jeho druhou nejobsáhlejší složkou.

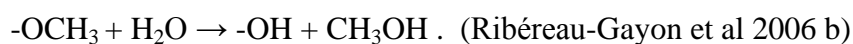
3.2.1 Metanol

Jedná se o nejjednodušší alifatický alkohol se sumárním vzorcem: CH₄O (funkční vzorec CH₃OH). V malém množství je metanol ve víně přítomen vždy. Běžně mezi 17 až 100 mg.l⁻¹ ve vínech bílých a 65 až 230 mg.l⁻¹ ve vínech červených. (Michlovský, 2014)

Tyto koncentrace nemají organoleptický význam a také zdaleka nedosahují hodnot, které by mohly být pro konzumenta toxické.

(Ribéreau-Gayon et al 2006 b) uvádí rozdíly v koncentraci závislé na délce a intenzitě macerace bobulí, což také vysvětluje výrazné rozdíly v obsahu metanolu ve vínech bílých oproti červeným. Důvodem jsou slupky bobulí, které obsahují pektiny, z nichž se posléze metanol vytváří - viz níže. Dalším podstatným faktorem je druh révy, ze které je víno vytvářeno. Hybridní odrůdy, např. *Vitis labrusca* + *Vitis vinifera*, mají ve slupkách vyšší množství pektinů, a tak při použití stejné technologie má výsledné víno vyšší obsah metanolu než víno vyrobené pouze z odrůd *Vitis vinifera*. Také použití pektolitických enzymů během předfermentační macerace zvýší obsah metanolu ve víně.

Vznik metanolu ve víně není zapříčiněn alkoholovou fermentací, ale pochází z enzymatické hydrolýzy methoxylových skupin pektinů během fermentace.



3.2.2 Etanol

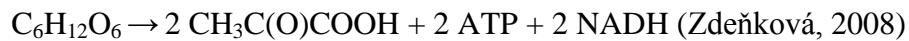
Po vodě je etanol nejpodstatnější složkou vína. Jedná se o druhý nejjednodušší alifatický alkohol se sumárním vzorcem C₂H₆O (funkční vzorec: C₂H₅OH). Jeho obsah ve víně se podle typu a technologie výroby pohybuje mezi 9 až 14,5 % obsahu, což odpovídá 70 až 110 g.l⁻¹. (Michlovský, 2014)

Vznik etanolu ve víně je zapříčiněn anaerobním biochemickým procesem nazvaným Alkoholová fermentace, kterou realizují kvasinky, u vína nejčastěji *Saccharomyces cerevisiae*. Sumárním vzorcem je:



Alkoholové kvašení probíhá ve dvou základních krocích, kde prvním krokem je glykolýza a druhým krokem je přeměna pyruvátu na etanol.

Glykolýza je metabolická dráha přeměny hexóz (nejčastěji glukózy) za vzniků dvou molekul pyruvátu. Výtěžkem jsou dvě molekuly ATP (adenosintrifosfát) jež slouží jako obecné energetické platidlo v biochemických buněčných procesech.



Druhou fází je samotný kvasný proces, který je složen ze dvou kroků:

1. Dekarboxylace pyruvátu na acetaldehyd a oxid uhličitý. Tato reakce je katalyzována enzymem pyruvátdekarboxylásou.



2. Vzniklý acetaldehyd je redukován na etanol. Tuto reakci katalyzuje enzym alkohol dehydrogenáza:



4 Vyšší alkoholy

Z fyzikálně chemického hlediska jsou vyšší alkoholy takové alkoholy, které mají ve své molekule více než dva atomy uhlíku a vyznačují se vyšší molekulární hmotností a vyšším bodem varu, než má etanol. Vyšší alkoholy jsou kvantitativně rozsáhlou skupinou látek, která se podílí na aroma v alkoholických nápojích. Při jejich označování se používá mimo termínu vyšší alkoholy též termín přiboudlinové alkoholy. Jsou to sekundární produkty alkoholové fermentace. Při senzoricke analýze můžou být poznány díky silnému a pronikavému zápachu a vliv mají také na chuť vína, kde dotváří charakter konkrétního nápoje. Vliv vyšších alkoholů na aromatické a chuťové profily vína je založen jednak na koncentraci v daném nápoji, a také na spolupůsobení s dalšími látkami. (Ribéreau-Gayon et al 2006 b ; Lambrechts, Pretorius, 2000)

Z pohledu koncentrace je možné označit vliv vyšších alkoholů na víno jak za pozitivní, tak za negativní. Koncentrace vyšších alkoholů ve víně se pohybuje v rozmezí 150 mg l^{-1} až 600 mg l^{-1} . Autoři se shodují, že pokud je koncentrace vyšších alkoholů nižší než 300 mg l^{-1} , předávají vínu žádoucí komplexitu vjemů a vína jsou hodnocena pozitivně. Naproti tomu koncentrace převyšující hranici 300 mg l^{-1} jsou pro víno nežádoucí a se stoupající koncentrací se kvalita vína zhoršuje. (Moreno-Arribas, Polo, 2009; Michlovský 2014)

Záleží také na stylu vína a ostatních komponentech tvořících aroma. Vzájemný vztah mezi jednotlivými volatilními komponenty může být pozorován například u různých odrůd. (Smyth, 2005) uvádí vliv 2 metyl-propanolu, 2.methyl-butanolu a 3 methyl-butanolu na odrůdy Chardonnay a Ryzlink rýnský. Tyto látky měly zásadní vliv pro odrůdu Chardonnay, ale pro Ryzlink rýnský se při tvorbě aromatického profilu senzoricke analýzou neprojevíly.

Vyšších alkoholů je z chemického pohledu velké množství, ale pro víno nejsou všechny významné. Koncentrace ve víně jsou také výrazně různé. Přehled vyšších alkoholů uvádí: Tab. 1 Vyšší alkoholy ve víně (Ribéreau-Gayon et al 2006 b ; Lambrechts, Pretorius, 2000)

Tab. 1 Vyšší alkoholy ve víně (Ribéreau-Gayon et al 2006 b ; Lambrechts, Pretorius, 2000)

Vyšší alkoholy ve víně					
Název	Funkční vzorec	Koncentrace ve víně mg.l-1	Bod varu °C	Prekurzorová aminokyselina	Aroma
Propan-1-ol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ OH	9.68	97	Threonin / 2-amino-máselná kys.	Rozpouštědlo, chemické tóny
Butan-1-ol	CH ₃ -CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ OH	0,5 - 8,5	117	-	Přiboudlinové aroma
Methyl-2-propan-1-ol	CH ₃ -CH(CH ₃)-CH ₂ -OH	9 - 140	107	Valin	Rozpouštědlo, chemické tóny
Methyl-2-butan-1-ol	CH ₃ -CH ₂ -CH(CH ₃)-CH ₂ -OH	15 - 150	129	Isoleucin	Marcipán / rozpouštědlo
Methyl-3-butan-1-ol	CH ₃ -CH(CH ₃)-CH ₂ -CH ₂ -OH	45 - 490	131	Leucin	Rozpouštědlo, chemické tóny
Hexan-1-ol	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH ₂ OH	0,5 - 12	158	2-Fenyl octová kyselina	Přiboudlinové / herbální aroma
Tyrosol	HO-φ-CH ₂ -CH ₂ OH	20-50	158	Tyrosin	Včelí vosk, med
Tryptophol	φ-NH-CH-C-CH ₂ -CH ₂ -OH	0-1	59	Tryptophan	-
Fenyl-2-ethanol	φ-CH ₂ -CH ₂ -OH	10 - 180	219	Fenylalanin	Růže, florální tóny

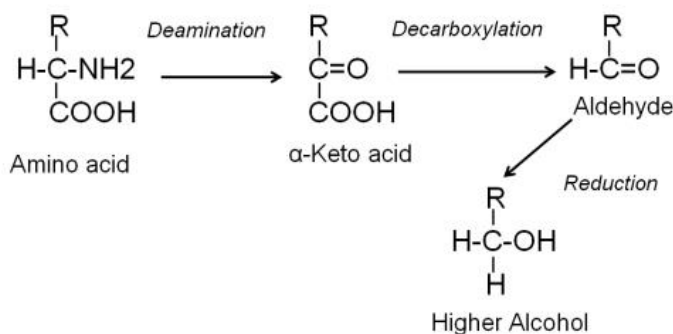
Tab. 1 tedy uvádí seznam nejdůležitějších vyšších alkoholů ve víně. Jedná se o alkoholy jak alifatické, tak o alkoholy s aromatickou skupinou. Z alifatických alkoholů jsou nejdůležitější propanol, isobutyl alkohol, aktivní amyl alkohol a isoamyl alkohol. Nejdůležitějším aromatickým alkoholem je fenyl-2-ethanol.

Z pohledu koncentrace jednotlivých alkoholů je nejpodstatnější složkou vyšších alkoholů isoamyl alkohol, který může, dle charakteristiky nápoje, tvořit rozmezí 40-70% celkové frakce vyšších alkoholů. Spolu s aktivním amyl alkoholem tvoří tyto dva amyl alkoholy nejzásadnější složku přiboudlinových alkoholů – více než 90%. Tyto hodnoty se netýkají jenom vína, ale jedná se i o hodnoty prokázané v destilátech, např. Brendy. (Lambrechts, Pretorius, 2000)

5 Vznik vyšších alkoholů

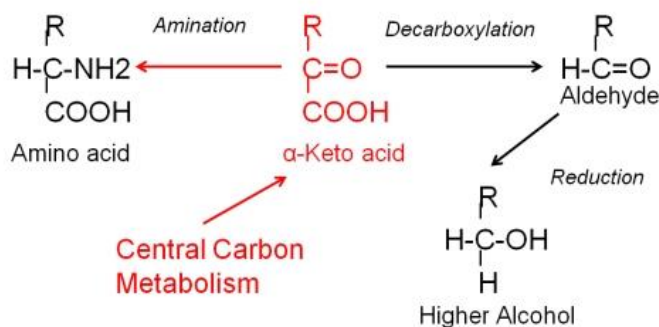
Vyšší alkoholy jsou sekundární produkty alkoholové fermentace. V bobulích révy vinné ani v moštu se nevyskytují. Jejich vznik během alkoholové fermentace je vysvětlován dvěma způsoby. Prvním způsobem je katabolické formování vyšších alkoholů z aminokyselin. Tyto reakce jsou obecně známy jako Ehrlichovy reakce. Druhou možností je vznik vyšších alkoholů z cukerných substrátů, kde se jedná o část biosyntetických drah při tvorbě aminokyselin kvasinkami, během alkoholové fermentace. (Lambrechts, Pretorius, 2000 ; Moreno-Arribas, Polo 2009) Oba dva systémy vzniku lze obecně vyjádřit: **Obr. 4** Ehrlichova reakce – obecná forma reakce. (*Key to diagnosing problem fermentations* [on-line] Davis : Univerzity of California. 2014) a **Obr. 5** Biosyntéza aminokyselin. (*Key to diagnosing problem fermentations* [on-line] Davis : Univerzity of California. 2014)

Ehrlich Pathway



Obr. 4 Ehrlichova reakce – obecná forma reakce. (*Key to diagnosing problem fermentations* [on-line] Davis : Univerzity of California. 2014)

Amino Acid Biosynthesis



Obr. 5 Biosyntéza aminokyselin. (*Key to diagnosing problem fermentations* [on-line] Davis : Univerzity of California. 2014)

Společné pro oba systémy vzniku vyšších alkoholů jsou dva body. Prvním z nich jsou dusíkaté látky a druhým jsou α -keto kyseliny. α -keto kyseliny jsou součástí obou typů reakcí a bodem, kde se obě dráhy setkávají – jak je vidět z **Obr. 4** a **Obr. 5**. Z celkového pohledu na vyšší alkoholy je prvek dusíku naprosto zásadním faktorem. U obou výše uvedených systémů jsou totiž dusíkaté látky důvodem, proč reakce jako takové nastávají - obecně řečeno. Při Ehrlichových reakcích dochází k využívání dusíku z aminokyselin na stavbu jiných, pro kvasinku v daný moment důležitějších aminokyselin. Při biosyntéze aminokyselin, jak již název naznačuje, dochází k tvorbě potřebných aminokyselin již z podstaty reakce samotné.

Obsah dusíkatých látek ve víně se pohybuje od 5 do 500 mg.l⁻¹. Tento objem je rozdělen na bílkoviny: 5-10% (které se z vína postupně ztrácejí, nebo jsou vyčeřeny), velkou část tvoří polypeptidy: 25-50%, aminokyseliny se vyskytují v množství: 25-50% a amoniakální dusík je zastoupen: 3-10%. (Michlovský, 2014) Vedle cukrů (hexózy – glukóza, fruktóza) jsou dusíkaté sloučeniny nejdůležitějšími výživovými substancemi v moštu. Kvasinkami asimilovatelný dusík (YAN) je tvořen jednak aminokyselinami a druhou složkou je amonium NH₄⁺. Proto, při předfermentačních rozborech moštu, jsou právě hodnoty YAN a ideálně i jejich rozklad na aminokyseliny a amoniakální dusík naprosto zásadní. Během metabolismu kvasinek probíhá několik kroků s dusíkatými komponenty. Dusíkaté sloučeniny jsou přímo přijímány a použity v biosyntetických reakcích. Dále mohou být převedeny na jiné dusíkaté komponenty a poté opět využity v biosyntetických reakcích. Také mohou být degradovány za uvolnění dusíku, který je poté použit pro metabolické potřeby buňky. (Murli D. [on-line] [cit. 2016-03-25])

Látky obsahující dusík se do buňky dostávají třemi způsoby. Jedná se o difuzi, usnadněnou difuzi a aktivní transport. Při difuzi je využíván jednoduchý průchod přes plasmatickou membránu (lipidovou dvouvrstvu) a vstup do buňky je bez jakékoliv asistence. Využíván je koncentrační gradient, kde koncentrace látek vně buňky je vyšší než uvnitř buňky. Při usnadněné difuzi je využívána asistence proteinů – tento způsob také nevyžaduje spotřebu energie. Ani jeden typ difuze neumožňuje nahromadění koncentrace látek proti koncentračnímu gradientu. Aktivní transport vyžaduje tzv. membránové transportní proteiny – nazývané též transportéry, které zprostředkovávají dopravu, což vyžaduje energii. Těchto transportérů je velké množství a vyznačují se různou mírou specifčnosti. Některé jsou schopny přenášet větší množství molekul a iontů, zatímco jiné mohou být specializovány na jeden typ molekuly, iontu. Aktivní

transport může zajistit nahromadění látek proti koncentračnímu gradientu. Většina látek obsahující dusík je do buňky přiváděna aktivním transportem. Obecně je toto prokázáno také skutečností, že koncentrace látek obsahující dusík je větší uvnitř buňky než v okolním médiu. (Murlí D. [on-line] [cit. 2016-03-25])

5.1 Ehrlichovy reakce

Ehrlichovy reakce lze popsat jako katabolismus alifatických amino kyselin (leucin, valin, isoleucin) aromatických aminokyselin (fenylalanin, tyrosin, tryptophan) a síru obsahujících amino kyselin (methionin), který vede ke vzniku vyšších (přiboudlinových) alkoholů a přiboudlinových kyselin - jedná se o enzymatické reakce. (Hazelwood, at al, 2008)

Reakce jsou pojmenovány podle německého biochemika Felixe Ehrlicha (1877 – 1942). Ten v roce 1904 po izolování a charakterizování isoleucinu a leucinu začal spojovat strukturální podobnosti mezi těmito aminokyselinami a vyššími alkoholy – aktivním amyl alkoholem a izoamyl alkoholem. Tato pozorování jej vedla k myšlence, že vyšší alkoholy mohou být deriváty aminokyselin. Potvrzení těchto pozorování bylo prokázáno přidáním aminokyselin leucinu nebo isoleucinu do moštů. Po ukončení fermentací bylo měřením zjištěno vyšší zastoupení přiboudlinových alkoholů. Reakce, jak je známe dnes, byly finálně popsány v roce 1911 německými vědci Neubauerem a Fromherzem. (Hazelwood, at al, 2008)

Dle (Moreno-Arribas, Polo, 2009) můžeme celý proces Ehrlichovy dráhy rozdělit na čtyři kroky. Na začátku máme aminokyselinu v mediu, která je aktivním transportem dopravena do buňky. Následuje deaminační krok, kdy z aminokyseliny vzniká α -keto kyselina. Tato kyselina je následně dekarboxylací přeměněna na aldehyd. Poslední krok může mít dva směry. První možností je redukce aldehydu na vyšší alkohol. Druhou možností je oxidace aldehydu na přiboudlinovou kyselinu.

5.1.1 Transport aminokyseliny do buňky

Transport aminokyselin do buňky je realizován aktivním transportem. Na tomto transportu se podílejí transportéry (dříve užíván také termín permeázy), což jsou membránové proteiny, které jsou schopny z mimobuněčného prostředí přepravit aminokyseliny do buňky. V případě alifatických aminokyselin se jedná o transportéry Bap2p a Bap3p. Aromatické aminokyseliny jsou přepravovány transportéry Tat1p a Tat2p a někdy se na přenosu může účastnit také Bap2p. Samostatnou skupinou je

aminokyselina methionin, který je přenášen transportéry Mup1p a Mup3p. Obecný transportér, který může přepravovat všechny skupiny amino kyselin, je Gap1p. (Moreno-Arribas, Polo 2009)

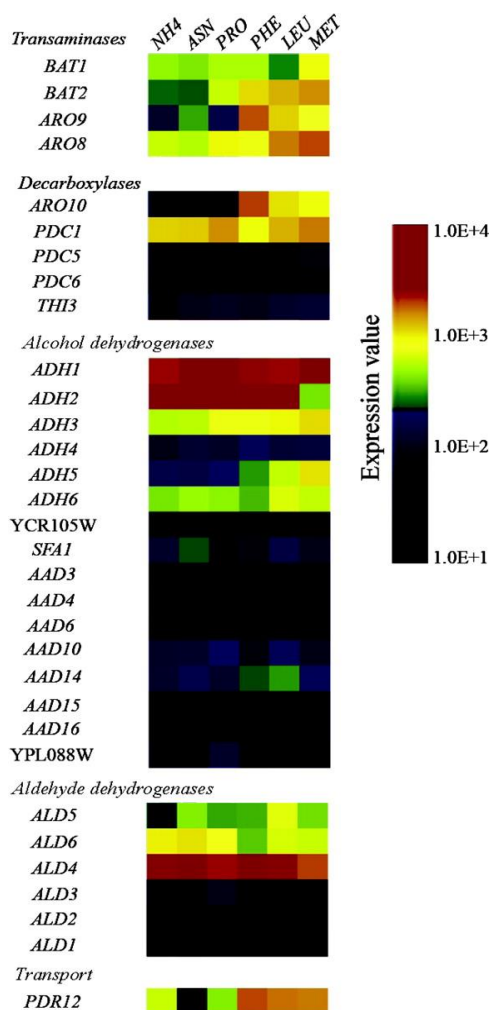
Příjem aminokyselin do buňky je inhibován amonnými ionty. To je z důvodu, že amonné ionty jsou posléze v médiu (moštu) vyčerpány. Transport aminokyselin probíhá po celou dobu fermentace a amonné ionty jsou primárně potřeba v rostoucí fázi růstu buněk. Příjem aminokyselin do buňky s sebou přináší ovšem zásadní problém se změnou pH. Při příjmu aminokyseliny do buňky vstupuje spolu s touto kyselinou i proton (H^+), a to z důvodu aktivního transportu transportéry. pH v moštu je oproti pH buňky rozdílné přibližně o 3 body na stupnici pH. To znamená, že koncentrace iontů H^+ je v moštu téměř tisíckrát vyšší, než je v buňce. Přísunem iontů H^+ tedy nastává pomalé zakyselování buňky. Buňka tento problém musí řešit vylučováním iontů H^+ zpět do moštu. Tento export iontů zpět do moštu je dosahován membránovou ATPázou, která funguje jako hydrogen iontová pumpa. Tento proces vyžaduje energii. Ta je získávána hydrolýzou molekul ATP (adenosin trifosfát). (Murli D. [on-line] [cit. 2016-03-25])

5.1.2 Transaminační krok Ehrlichovy reakce

Saccharomyces cerevisiae má čtyři proteiny, které jsou zapojeny do iniciace transaminačního kroku Ehrlichových reakcí. Jedná se o proteiny Twt1p – které jsou také známy pod termíny Bat1p nebo Eca39p. Jedná se o mitochondriální aminokyselinové aminotransferázy, které mají rozvětvené řetězce. Další skupinou je Twt2p, které jsou známé pod označením Bat2p nebo Eca40p a jedná se o cytosolový izozom. Mitochondriální izozymy mají vyšší expresi v měřených kulturách během exponenciálního růstu a následně jsou potlačovány během stacionární fáze. Naproti tomu cytosolový izozom má přesně opačnou expresi. Při testech s geneticky kódovanými enzymy bylo prokázáno (a to dvěma nezávislými skupinami), že při mutaci Eca40p vzniká výrazný pokles produkce isobutanolu. Byla pozorována také snížená produkce aktivního amyl alkoholu a isoamyl alkoholu. Další zajímavé výzkumy byly provedeny s geny *BAT1* a *BAT2*, jedná se o kódující transaminační geny. V případě výrazné exprese genu *BAT1* v komerčních vinných kvasinkách bylo pozorováno vyšší množství produkce isoamyl alkoholu, isobutyl alkoholu, 2-metylpropanové kyseliny a propanové kyseliny. V případě zvýšené exprese genu *BAT2* bylo nalezeno vyšší množství isobutyl alkoholu, 2-metylpropanové kyseliny a propanové kyseliny. Vymazáním těchto genů bylo dosaženo výrazného snížení těchto látek. Úpravy

v expresích těchto transaminačních genů mohou poskytovat zajímavé modulace aromatických profilů vína. (Moreno-Arribas, Polo 2009; Hazelwood, et al, 2008)

Dalšími enzymy, které se zapojují do transaminační části Ehrlichovy reakce jsou Aro8p a Aro9p. U těchto enzymů bylo zpočátku pozorováno, že se jedná o aromatické aminokyselinové aminotransferázy. Ovšem Aro8p také vykazoval aktivitu s metioninem a leucinem jako dárce amino skupiny a s fenylpyruvátém jako amino příjemcem a obráceně α -keto kyselina jako amino příjemce a fenylalanin jako amino dárce. Dle výzkumů tedy enzymy Aro8p a Aro9p působí jako široké – substrátově specifické - aminokyselinové transaminázy v Ehrlichových reakcích. Tato pozorování byla prokázána v širokoprofilové genové expresi, kde růst *Saccharomyces cerevisiae*, v kulturách s omezeným obsahem glukózy a s fenylalaninem, methionin a leucinem jako jedinými zdroji dusíku, jsou ARO9 a TWT2 konzistentně stimulovány. Naproti tomu geny, v kultuře s amoniem, prolinem a asparaginem jako jedinými zdroji dusíku (které nejsou zahrnuty v katabolismu Ehrlichových drah) stimulovány nejsou. (Moreno-Arribas, Polo 2009; Hazelwood, et al, 2008)



Obr. 6 Teplotní mapa totožnosti genů (Hazelwood, at al, 2008). zobrazuje geny, které mohou kódovat enzymy zapojené do Ehrlichových reakcí. Expresse genů na vysokých úrovních je zobrazena červenou barvou a geny s nízkou expresí jsou zobrazovány černě. Obr. 6 reprezentuje transkriptní úroveň genů v aerobním prostředí s limitovanou glukózou a kulturou *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK 113-7D. Je zobrazen růst při různých zdrojích dusíku [(NH₄)₂SO₄] (NH₄) Aspariginem (ASN); prolinem (PRO), fenylalaninem (PHE); leucinem (LEU) a methioninem (MET). Tanskriptní úroveň byla stanovena s Affymetrix GeneChips YG-S98 a je složena z průměrů tří nezávislých pozorování.

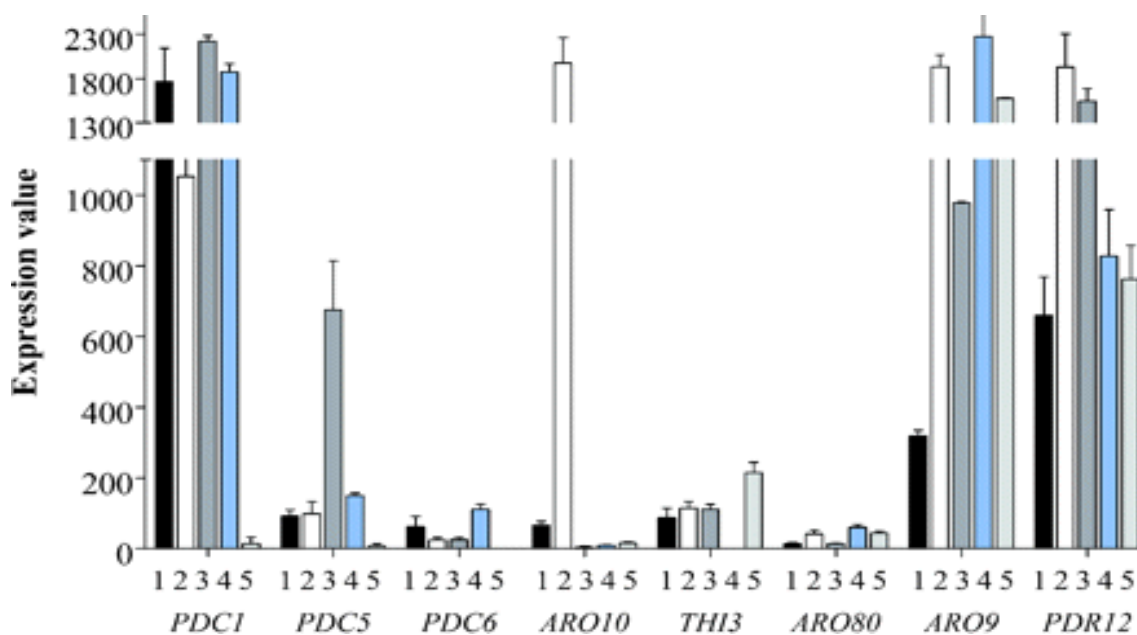
Obr. 6 Teplotní mapa totožnosti genů (Hazelwood, at al, 2008).

5.1.3 Dekarboxylační krok Ehrlichovy reakce

Dekarboxylační krok v Ehrlichových reakcích je nevratným dějem, který přemění α -keto kyselinu na aldehyd. Původně byl tento krok připisován pyruvát dekarboxyláze. Následně bylo kvasinkovým genomem prokázáno, že na tomto kroku se může podílet pět genů. Tyto geny vykazují sekvenční podobnosti s thiamindifosfátem (TPP), což je koenzym podílející se na různých enzymatických reakcích – v našem případě také na oxidativní dekarboxylaci α -keto kyselin. Tři z těchto genů (*PDC1* ; *PDC5* a *PDC6*) kódují pyruvát dekarboxylázu, a *ARO10* a *THI3* jsou alternativní geny pro dekarboxylázy v Ehrlichově reakci. Pět strukturálních genů, u kterých se předpokládá kódování (TPP) v závislosti na dekarboxyláze (*PDC1* ; *PDC5* a *PDC6* ; *ARO10* a *THI3*), bylo zkoumáno jak jednotlivě, tak v kombinacích, zda enzymy katalyzují dekarboxylaci jednotlivých α -ketokyselin. Tyto výzkumy prokázaly, že hlavní dekarboxylázou podílející se na katabolismu leucinu je ta, která je kódována *THI3*. Naproti tomu jsou zde tři geny (*PDC1* ; *PDC5* a *PDC6*), které se podílí na kódování

dekarboxylázy způsobující katabolismus valinu. V katabolismu isoleucinu bylo dokázáno, že některý ze skupiny genů (*PDC1* ; *PDC5* a *PDC6* ; *ARO10* a *THI3*) se prokazatelně podílí na přeměně isoleucinu na aktivní amyl alkohol. Dále bylo také prokázáno, že *THI3* nemá žádný vliv na katabolismus aromatických aminokyselin, na tomto se podílí některý ze čtyř zbývajících genů. Katabolismus methioninu (dekarboxylace α -KMBA) je ovlivňován genem *Aro10p*. (Moreno-Arribas, Polo 2009; Hazelwood, at al, 2008)

V umělých kulturách kultivovaných leucinem, methioninem nebo fenylalaninem jako jedinými zdroji dusíku jsou přiboudlinové alkoholy a přiboudlinové kyseliny daných aminokyselin produkovány ve velmi vysokém množství. V širokoškálových substrátech byly měřeny buněčné extrakty z těchto kultur na přítomnost α -keto kyselinové dekarboxylázy a jejich aktivity. Pouze *ARO10* byl jediným dekarboxylačním genem, jehož transkripční profil významně koreloval s α -keto kyselinovou dekarboxylázovou aktivitou. Komplexní charakterizace *Aro10p*, kde byly použity kombinace genetických, fyziologických a biochemických postupů, potvrdila, že *Aro10p* je široko-substrátová dekarboxyláza. Tyto experimenty také prokázaly existenci *Aro10p* α -keto kyselinové dekarboxylázové aktivity, která vyžaduje funkční alely *THI3* a alespoň jeden další pyruvát dekarboxylační gen (*PDC1* ; *PDC5* a *PDC6*). Transkripční analýza a měření dekarboxylázové aktivity u *Saccharomyces cerevisiae* s kmeny *aro10* Δ dvojitý *aro10* Δ a *thi3* Δ ; a čtyřnásobné *pdc1* Δ *pdc5* Δ *pdc6* Δ *aro10* Δ mutantní geny pěstované v umělých kulturách s omezeným zdrojem uhlíku a fenylalaninem jako jediným zdrojem dusíku naznačily, že *PDC5* je silně regulován v pozadí *aro10* Δ a také kóduje širokosubstrátovou α -keto kyselinovou dekarboxylázu. Exprese *PDC5* závisí na přítomnosti *THI3*, to je v kontrastu s expresí *ARO10* (*pdc1* Δ *pdc5* Δ *pdc6* Δ *thi3* Δ kmen), exprese *THI3* (*pdc1* Δ *pdc5* Δ *pdc6* Δ *aro10* Δ kmen) nevede k téměř žádné α -keto kyselinové dekarboxylázové aktivitě. Zkoumání *THI3* tedy v podstatě prokázalo, že se podílí na regulaci thiamin homeostázy v *S. cerevisiae*. Z pozorování tak vyplývá, že role *THI3* v Ehrlichových reakcích je spíše regulační než katalytická. Zatímco *Pdc1*, *Pdc5*, *Pdc6* a *Aro10* jsou cytosolové izoenzymy, tak *Thi3* je jak cytosolový, tak jaderný enzym. Tato skutečnost tak podporuje jeho regulační funkci. Zkoumání těchto katalytických vlastností pěti (*Pdc1*, *Pdc5*, *Pdc6* *Aro10* *Thi3*) TPP dekarboxyláz je nezbytné pro konečné určení specifity těchto enzymů. (Moreno-Arribas, Polo 2009 ; Hazelwood, at al, 2008)



Obr. 7 Expresní profil pěti TPP dekarboxylačních genů. (Hazelwood, at al, 2008)

Obr. 7 zobrazuje profil exprese dekarboxylačních genů v různých mutantních kmenech, při rychlosti ředění $0,1 \text{ h}^{-1}$ v kulturách s omezeným uhlíkem. Expresní hodnoty jsou měřeny ve standardních odchytkách dat ze dvou nezávislých měření. 1. růst v kultuře s omezeným zdrojem uhlíku a $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ jako zdrojem dusíku. 2. růst v kultuře s omezeným zdrojem uhlíku a fenylalaninem jako zdrojem dusíku. 3. *aro10 Δ* kmen v kultuře s omezeným zdrojem uhlíku a fenylalaninem jako zdrojem dusíku. 4. *aro10Δ, thi3Δ* kmen v kultuře s omezeným zdrojem uhlíku a fenylalaninem jako zdrojem dusíku. 5. *pdc1Δ pdc5Δ pdc6Δ aro10Δ* kmen v kultuře s omezeným zdrojem uhlíku a fenylalaninem jako zdrojem dusíku.

5.1.4 Redukční a oxidační krok Ehrlichovy reakce

Posledním klasickým krokem v Ehrlichově reakci je redukce (oxidace) aldehydu vzniklého dekarboxylací α -keto kyseliny. Z pohledu oxidace nebo redukce aldehydu bylo zjištěno, že v glukózových kulturách jsou aminokyseliny, které lze převést Ehrlichovými reakcemi, téměř kompletně převedeny na přiboudlinové alkoholy. Přiboudlinové kyseliny jsou vytvářeny ve velmi malém množství. Studie, které se zabývají rovnováhou mezi oxidací a redukcí přiboudlinových aldehydů, ukazují významnou závislost na kultivační kondici média, kde probíhá fermentace. V aerobních růstových kulturách s omezeným obsahem glukózy a různými aminokyselinami (leucin, methionin, fenylalanin) jako zdroji dusíku jsou tyto aminokyseliny převážně oxidovány na přiboudlinové kyseliny a vznikají pouze nízké koncentrace vyšších alkoholů. Takto

nastavené kultury vykazují o 40% nižší výnos biomasy, než jsou kultury s dalšími zdroji dusíku. Znamená to, že energetický odtok je spojován s produkcí přiboudlinových kyselin. Tyto slabé organické kyseliny jsou silně hydrofobní a dochází tak k výraznému čerpání (ztrátě) ATP při překonávání pH gradientu plasmatické membrány. V kulturách s dostatkem glukózy dochází k růstu *S. cerevisiae* převážně díky alkoholové fermentaci. V případě použití fenylalaninu jako jediného zdroje dusíku je přeměněno 90% na vyšší alkohol (fenyl-2-ethanol) a pouze 10% na přiboudlinovou kyselinu (fenylacetát). Další měření prokázala, že v glukózových kulturách, za anaerobního stavu, je fermentační disimilací převeden fenylalanin kompletně na fenyl-2-ethanol. (Hazelwood, et al, 2008)

Za anaerobních podmínek může mít redukční krok Ehrlichovy reakce významný vliv na redoxní metabolismus. Během fermentace (fáze růstu kvasinek) *S. cerevisiae* vzniká přebytek NADH, který může být oxidován glycerol-3-fosfát dehydrogenázou na glycerol – i když tvorba glycerolu vyžaduje ATP a je tak pro kvasinky energeticky nevýhodná. Katabolismus aminokyselin tak může zajistit alternativní, ale energeticky úspornou regeneraci: $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{NAD}^+$. Role této skutečnosti ještě nejsou dostatečně popsány. V respiračně fermentačních kulturách s omezeným zdrojem dusíku *S. cerevisiae* produkuje méně glycerolu, když je jako zdroj dusíku dodán valin na místo amonné formy. (Hazelwood, et al, 2008) Naproti tomu (Lambrechts, Pretorius, 2000) uvádí, že přesná funkce vzniku vyšších alkoholů není jednoznačně známa a redukce aldehydů v Ehrlichově reakci není zásadní při udržování redukčně oxidační stability v buňce.

Genom *S. cerevisiae* obsahuje 16 genů alkohol dehydrogenázy, 6 genů aldehyd dehydrogenázy a nejméně 2 geny široce spektrální reduktázy, která katalyzuje pyridinové nukleotidy v závislosti na vzájemnou přeměnu aldehydu na alkohol. Užitím kmenů, které obsahují všechny možné kombinace mutací, ovlivňují sedm AAD genů. Pět *ADH* genů a *SFA1*. Výzkumy bylo prokázáno, že poslední krok Ehrlichovy reakce může být katalyzován ethanol dehydrogenázou (*Adh1p*, *Adh2p*, *Adh3p*, *Adh4p*, *Adh5p*) nebo *Sfa1p* (formaldehyd dehydrogenázou). Dále, použitím NADPH aldehyd reduktázy kódované *YPR1* a *GRE2* se ukazuje, že mají aktivitu vůči 2-metylbutyraldehydu a izovalealdehydu. Celá tato problematika je dosti komplikovaná a připisovat jednotlivé, jednoznačné role aldo – ketózovým reduktázám ve většině organismů je problematické. Důvodem je výrazné překrývání specifčnosti enzymů a přítomnosti dalších souvisejících enzymů. Transkripční údaje z pozorování *S. cerevisiae*, pěstované

s omezeným obsahem glukózy a s fenylalaninem, methioninem nebo lecinem jako jedinými zdroji dusíku, nebyly jednoznačné pro žádnou z 16 alkohol dehydrogenáz a 6 aldehyd dehydrogenáz. Transkripční profily korelovaly s přítomností jak přiboudlinových alkoholů, tak přiboudlinových kyselin. (Moreno-Arribas, Polo 2009 ; Hazelwood, at al, 2008)

5.1.5 Úlohy Ehrlichových reakcí

Růst *S. cerevisiae* v přítomnosti přiboudlinových alkoholů (např. isoamyl alkoholu) způsobuje pseudohyfální růst. Jedná se o specifický růst buněk, kterým se snaží kvasinka dostat ke zdroji dusíku. Tyto protáhlé, vláknité buňky, které připomínají hyfy, se formují ze standardní oválné buňky. Pučením se vytváří protáhlá vláknitá pseudohyfa, která se po dokončení tvorby standardního obsahu cytoslou normálně oddělí. (Bartošová – Kalbačová M. 1998)

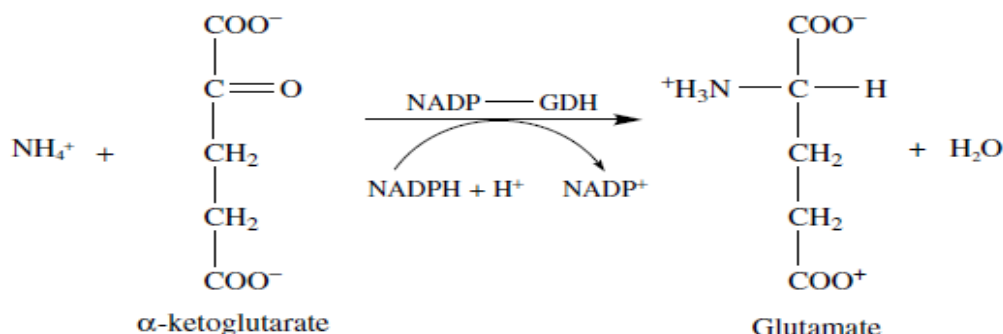
Tyto výrazné morfologické změny jsou doprovázeny zvýšením aktivity sukcinát dehydrogenázy a zvýšením obsahu chitinu. Tento stav není omezen pouze na přítomnost isoamyl alkoholu, také přidáním fenyl-2-etanolu nebo 2-indol acetátu (rostlinný hormon auxin) je ovlivněna morfogeneze, tedy, v tomto případě, invazivní – pseudohyfální růst. Fenyl-2-ethanol stimuluje morfologické změny expresí genu *FLO11* pomocí Tpk2p mechanismu a regulace transkripce po působení 2-indol acetátu zahrnuje enzym Yap1p jako klíčového zprostředkovatele reakce. Tato pozorování tak ukazují, že jednou z funkcí Ehrlichových reakcí by mohla být tvorba komponentů *Quora sensing*, což je, zjednodušeně řečeno, mechanismus mezibuněčné komunikace. Tento mechanismus umožňuje mikroorganismům se adaptovat na změny v jejich životním prostředí. (Hazelwood, at al, 2008)

Rovnováha konstant transaminačních reakcí je často blízko 1. Příkladem může být fenylalanin-3-fenylpyruvát α -ketoglutarát-glutamát aminotransferázní reakce. Za určitých fyziologických podmínek jsou koncentrace substrátů této reakce (α -ketoglutarát $36 \mu\text{mol l}^{-1}$ a fenylalanin $52 \mu\text{mol l}^{-1}$) často nižší, než je požadovaný produkt (glutamát $5,850 \mu\text{mol l}^{-1}$). Vzhledem k tomu má tato transaminační reakce zásadní úlohu v podmínkách, kdy jsou koncentrace dusíku velmi nízké a zvýšení koncentrace v substrátu již není možné. K řešení tohoto problému může buňka využít aktivního transportu aminokyselin intracelulárně. Ovšem i zde se vyskytuje problém, a to v často špatné rozpustnosti těchto látek ve vodě. Následně je nutné udržet roztok v

nízké koncentraci čtvrté sloučeniny účastníci se této reakce, a to 3-fenylpyruvátu. Pokud jsou tedy brány jako primární zdroje dusíku alifatické, aromatické a síru obsahující aminokyseliny, je transaminační reakce možností, jak plně využít zdrojů dusíku z aminokyselin a dekarboxilace vzniklých α -keto kyselin zase snižuje jejich následnou vzrůstající koncentraci v intracelulárním prostoru. (Hazelwood, et al, 2008)

5.2 Biosyntéza aminokyselin

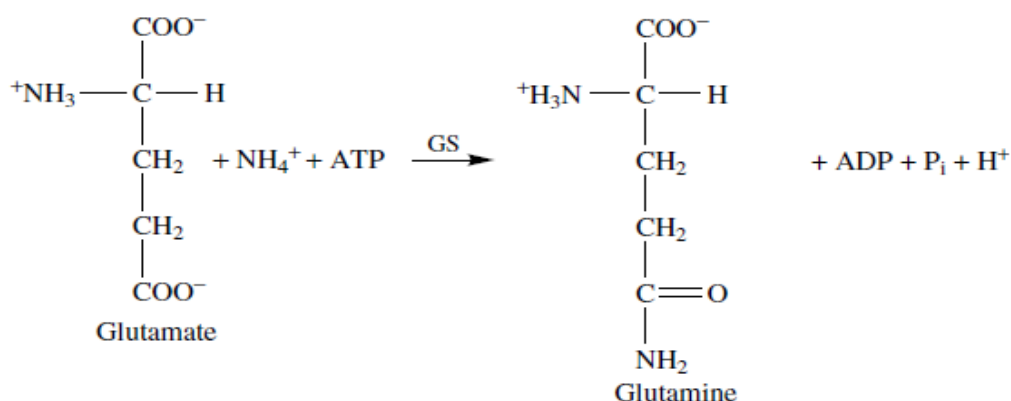
Jako zdroje dusíku pro kvasinky lze jednoznačně určit amonné ionty a aminokyseliny. Tyto látky se vyskytují v moštu a kvasinka je transportuje do svého intracelulárního prostoru, viz kapitola 5.1.1 Dusík jako takový je nezbytnou součástí aminokyselin, jež slouží k tvorbě oligopeptidů a proteinů. Kvasinky mohou většinu aminokyselin syntetizovat. Syntéza aminokyseliny probíhá připojením amonného iontu na uhlíkatý skelet, který pochází z metabolismu sacharidů. Důležitou roli v těchto reakcích hrají glutamát a glutamin. NADP^+ glutamát dehydrogenáza, která je kódována genem GDH1, produkuje glutamát z amonného iontu a z α -ketoglutarátové molekuly, která je produktem citrátového cyklu, viz Obr. 8 Vznik glutamátu (Ribéreau-Gayon et al 2006 a)



Obr. 8 Vznik glutamátu (Ribéreau-Gayon et al 2006 a)

Kvasinky také vlastní NAD^+ glutamát dehydrogenázu, která je kódovaná genem GDH2. Tato dehydrogenáza je zapojena v oxidativním katabolismu glutamátu. Nastalá reakce je opačná k reakci v předcházejícím případě. Uvolněný amonný iont je využit kvasinkou k syntéze glutaminu. NADP^+ GDH má vysoký výkon v situaci, kdy je kvasinka kultivována v médiu s vysokým obsahem amonných iontů jako zdroji dusíku. NAD^+ GDH aktivita je na nejvyšší úrovni, když je hlavním zdrojem dusíku glutamin, který byl vytvořený z glutamátu a amonného iontu. Tato aminace vyžaduje hydrolyzu

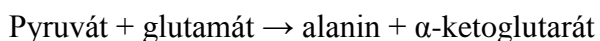
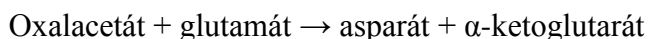
ATP. Tuto reakci zobrazuje: Obr. 9 Aminace glutamátu v glutaminové syntéze (Ribéreau-Gayon et al 2006 a)



Obr. 9 Aminace glutamátu v glutaminové syntéze (Ribéreau-Gayon et al 2006 a)

Díky transaminačním reakcím tedy glutamát slouží jako nosič amino skupiny, potřebné k tvorbě různých aminokyselin v biosyntéze aminokyselin. Transaminázním kofaktorem těchto reakcí je pyridoxal fosfát, který vzniká odvozením z pyridoxinu, což je vitamin B₆.

Uhlíkaté skelety, na které se napojují dusíkaté báze, mohou pocházet z různých biochemických dějů. První skupinou jsou pyruvát, 3-fosfoglycerát a fosfoenolpyruvát, což jsou meziproducty glykolýzy. Další skupinou jsou α -ketoglutarát a oxalocetát, které mají původ v citrátovém cyklu, poslední důležitou skupinou jsou ribóza 5-fosfát a erythróza 4-fosfát, jež jsou produkty pentózo fosfátového cyklu. (Ribéreau-Gayon et al 2006 a) Některé z reakcí jsou poměrně jednoduché (vznik asparátu a alaninu) a jejich obecné vyjádření je:



Další biosyntetické dráhy jsou již komplikovanější a odpovídají stejné složitosti jako ve všech živých organismech na světě.

Biosyntéza aminokyselin se dělí do šesti základních skupin, a to dle původu uhlíkatého skeletu. Toto zobrazuje: Tab. 2 Obecné dráhy biosyntézy aminokyselin (Ribéreau-Gayon et al 2006 a)

Tab. 2 Obecné dráhy biosyntézy aminokyselin (Ribéreau-Gayon et al 2006 a)

Obecná biosyntéza aminokyselin								
1	α -ketoglutarát	→	Glutamát	→	Glutamin			
					Prolin			
					Arginin			
2	Oxalacetát	→	Asparát	→	Asparagin			
					Lysin			
					Threonin		→	Isoleucin
					Methionin		→	Homocystein
3	3-fosfoglycerát	→	Serine	→	Cystathionin	→	Cystein	
					Glycin			
4	Ribóza 5-fosfát			→	Histidin			
5	Pyruvát			→	Alanin			
					Valin			
					Leucin			
6	Fosfoenolpyruvát , Erythrosa 4-fosfát			→	Fenylalanin			
					Tyrosin			
					Tryptophan			

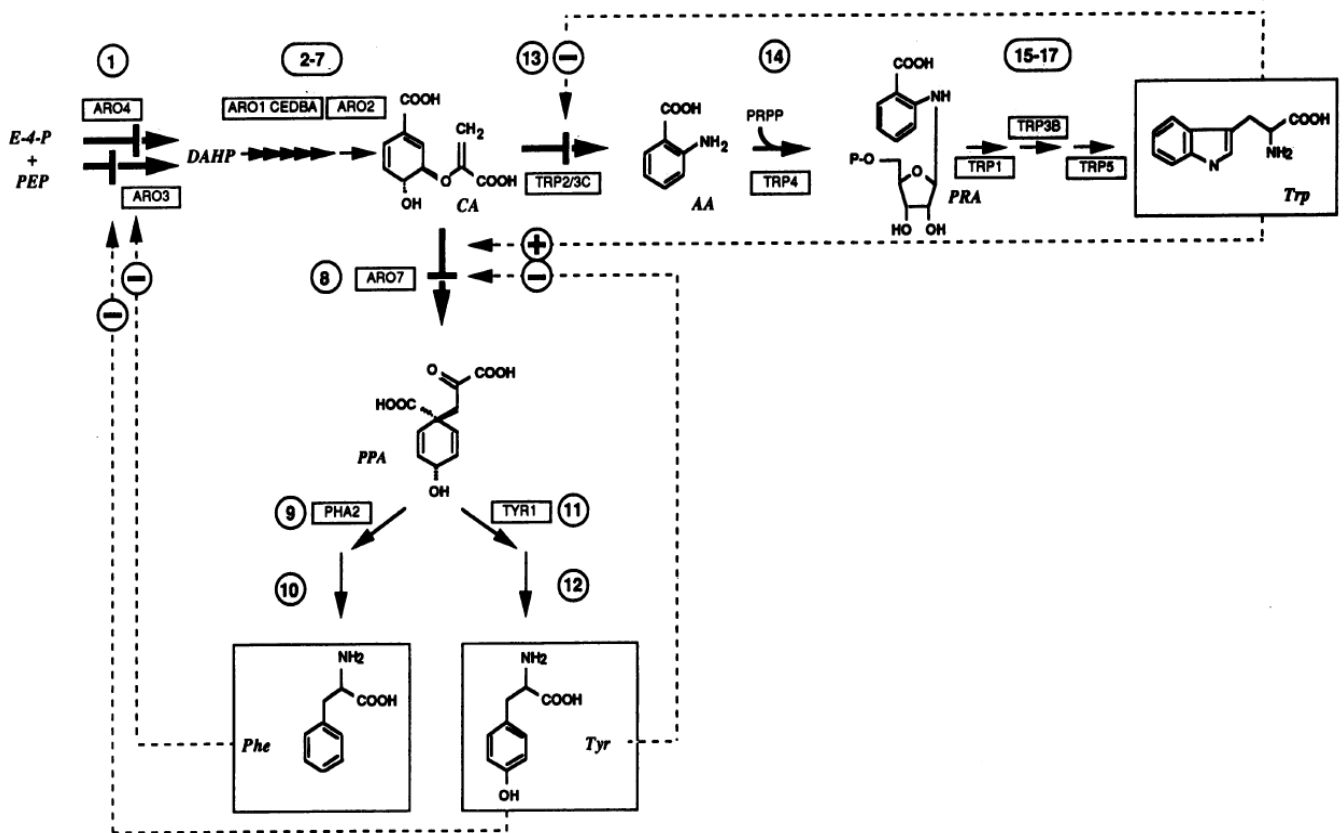
Z α -ketoglutarátu vzniká glutamát, ze kterého jsou následně formovány prolin, glutamin a arginin. Asparagin, methionin, lysin, threonin a isoleucin jsou deriváty asparátu, který vzniká z oxalacetátu. 3-fosfoglycerát vede k tvorbě serinu a následně glycinu. Kondenzací homocysteinu a serinu vzniká cystathionin, který je prekurzorem cysteinu. Pyruvát je základem syntézy alaninu, valinu a leucinu. Histidin, která je formována z imidazolového cyklu, vzniká z Ribóza 5-fosfátu a adeninu za pomoci ATP.

5.2.1 Biosyntéza aromatických aminokyselin

Mezi aminokyseliny, které mají ve své struktuře aromatickou skupinu, patří tryptophan, fenylalanin a tyrosin. Biosyntéza těchto aminokyselin patří mezi nejlépe prozkoumané syntézy aminokyselin. *S. cerevisiae* je schopná si všechny tři aromatické aminokyseliny syntetizovat. Inhibitorem syntézy aromatických aminokyselin je glyfosfát (*N*-fosfometylglycin), který také bývá využíván jako herbicid a inhibitor růstu mikrobiálních rostlin a živočichů. (Gerhard B. H. 1991)

Aminokyseliny fenylalanin, tyrosin a tryptophan pocházejí z erythrosy 4-fosfátu a fosfoenolpyruvátu. Tyto dvě látky jsou přes šikimátovou dráhu a následně dvě

biosyntetické větve katalyzovány enzymatickými reakcemi. Toto zobrazuje: Obr. 10
 Biosyntéza aromatických aminokyselin (Gerhard B. H. 1991)



Obr. 10 Biosyntéza aromatických aminokyselin (Gerhard B. H. 1991)

Tato biosyntetická dráha je konstantní pro všechny eukaryotní a prokaryotní organismy. Jak je vidět v Obr. 10, vznik aromatických aminokyselin má dvě zásadní větve. Ty rozdělují vznik těchto aminokyselin na větev, kde vzniká tryptophan, a větev, kde je syntetizován fenylalanin s tyrosinem. Posledním společným bodem všech tří kyselin je kyselina chorismová (CA). Biosyntéza tryptophanu z kyseliny chorismové pokračuje v pěti konstantních krocích ve všech typech organismů. Naproti tomu biosyntéza fenylalaninu a tyrosinu existuje ve dvou nezávislých trasách. Fenylalanin může být vytvářen buď z arogenete nebo z fenylpyruvátu a syntéza tyrosin může pocházet buď z arogenete, nebo z 4-hydroxy fenylpyruvátu. Ovšem při výzkumech *S. cerevisiae* byly nalezeny pouze prekurzory fenylpyruvát a 4-hydroxy fenylpyruvát. (Gerhard B. H. 1991)

Syntéza aromatických aminokyselin je pro buňku velmi náročná. Co se týká spotřeby energie, tak na vytvoření 1 mol tryptophanu je zapotřebí 78 mol ATP.

Fenylalanin má spotřebu 65 mol ku 1 a tyrosin 62 mol ku 1. V průměru jsou tyto hodnoty přibližně dvakrát vyšší než u ostatních aminokyselin. Také koncentrace aromatických aminokyselin v buňce je jednou z nejnižších mezi aminokyselinami. Biosyntéza aminokyselin v *S. cerevisiae* je řízena dvěma mechanismy. Prvním je regulace syntézy enzymů, jež probíhá regulací genové exprese, a druhým mechanismem je regulace enzymatické aktivity, jež je řízena uhlíkovým průtokem. Na transkripční úrovni je nejdůležitějším strukturálním genem biosyntézy aromatických aminokyselin (v případě *S. cerevisiae*) transkripční aktivátor GCN4. Tento protein je regulátorem komplexní regulační sítě a je znám také jako obecný aminokyselinový kontrolor. Na enzymatické úrovni je uhlíkový průtok řízen hlavně modulací enzymů v prvním kroku reakce a v místě větvení reakce. Obecně platí, že koncové produkty hlavních drah slouží zároveň jako čidla pro průtok uhlíku. (viz Obr. 10 Biosyntéza aromatických aminokyselin (Gerhard B. H. 1991))

Biosyntézu aromatických aminokyselin také můžeme vyjádřit v krocích, kde se na jednotlivých úsecích podílejí různé enzymy, které jsou kódovány různými geny. Prvním stupněm je tedy šikimátová dráha, jež je ovlivněna sedmi enzymatickými reakcemi, které z fosfoenolpyruvátu a erythroa 4-fosfátu vytváří kyselinu chorismovou. Jednotlivé kroky zobrazuje: Obr. 11 Šikimátová dráha v biosyntéze aromatických aminokyselin (Gerhard B. H. 1991)

Reaction	Compound	Enzyme designation	Gene	Chromosome
1	PEP + E4P ↓	DAHP synthase (EC 4.1.2.15)	<i>ARO3</i> <i>ARO4</i>	IV II
2	DAHP ↓	DHQ synthase (EC 4.6.1.3)	<i>ARO1C</i>	IV
3	DHQ ↓	DHQ dehydratase (EC 4.2.1.10)	<i>ARO1E</i>	IV
4	DHS ↓	DHS dehydrogenase (EC 1.1.1.25)	<i>ARO1D</i>	IV
5	Shikimate ↓	Shikimate kinase (EC 2.7.1.71)	<i>ARO1B</i>	IV
6	Shikimate 3-phosphate ↓	EPSP synthase (EC 2.5.1.19)	<i>ARO1A</i>	IV
7	EPSP ↓	Chorismate synthase (EC 4.6.1.4)	<i>ARO2</i>	VII
	Chorismate ↓			
	Phe, Tyr, Trp, ubiquinone, <i>p</i> -aminobenzoate, vitamin K			

Obr. 11 Šikimátová dráha v biosyntéze aromatických aminokyselin (Gerhard B. H. 1991)

Kyselina chorismová slouží také jako meziprodukt k formování vitamínu K, ρ -aminobenzoátu a ubichinonu.

Další část biosyntézy aromatických aminokyselin je rozdělena na formování tryptofanu Obr. 13 Biosyntéza tryptofanu (Gerhard B. H. 1991) na jedné straně a fenylalaninu a tyrosinu Obr. 12 Biosyntéza fenylalaninu a tyrosinu (Gerhard B. H. 1991) na straně druhé.

Reaction	Compound	Enzyme designation	Gene	Chromosome
8	Chorismate ↓	Chorismate mutase (EC 5.4.99.5)	<i>ARO7</i>	XVI
9	Prephenate ↓	Prephenate dehydratase (EC 4.2.1.51)	<i>PHA2</i>	XIV
10	Phenylpyruvate ↓ Phenylalanine	Phenylalanine aminotransferase		
8	Chorismate ↓			
11	Prephenate ↓	Prephenate dehydrogenase (EC 1.3.1.13)	<i>TYR1</i>	II
12	4-Hydroxyphenylpyruvate ↓ Tyrosine	Tyrosine aminotransferase		

Obr. 12 Biosyntéza fenylalaninu a tyrosinu (Gerhard B. H. 1991)

Reaction	Compound	Enzyme designation	Gene	Chromosome
13	Chorismate + glutamine ↓	Anthranilate synthase (EC 4.1.3.27) (glutamine amidotransferase)	<i>TRP2</i> <i>TRP3C</i>	V XI
14	Anthranilate + PRPP ↓	Anthranilate phosphoribosyltransferase (EC 2.4.2.18)	<i>TRP4</i>	IV
15	PRA ↓	PRA isomerase	<i>TRP1</i>	IV
16	CDRP ↓	InGP synthase (EC 4.1.1.48)	<i>TRP3B</i>	XI
17	InGP + serine ↓ Tryptophan	Tryptophan synthase (EC 4.2.1.20)	<i>TRP5</i>	VII

Obr. 13 Biosyntéza tryptofanu (Gerhard B. H. 1991)

Z Obrázků 11, 12 a 13 tedy vyplývá, že stejně jako Ehrlichovy reakce, tak i biosyntézu aminokyselin je možné dostatečně pochopit, pokud rozkryjeme systém enzymatických reakcí, kde jsou jednotlivé enzymy kódovány konkrétními geny.

5.4 Faktory ovlivňující vznik vyšších alkoholů

Různé vědecké práce se, s určitou mírou rozdílnosti, shodují na faktu, že na vzniku vyšších alkoholů v alkoholických nápojích se podílejí obě možnosti jejich syntézy. Shoda také panuje v množství, které je jednotlivou dráhou vytvořeno. Obecně lze říci, že větší množství vyšších alkoholů vzniká díky biosyntéze aminokyselin a Ehrlichovy reakce mají podíl nižší. Například (Michlovský, 2014) uvádí, že 75% vyšších alkoholů pochází z biosyntézy aminokyselin a pouze zbývající čtvrtina je z katabolismu aminokyselin.

Faktorů, které ovlivňují vznik vyšší alkoholů, je větší množství. Patří mezi ně:

- Druh a kmen kvasinek
- Počáteční obsahy cukrů
- Fermentační teplota
- pH moštu
- Obsah kvasinkami asimilovatelného dusíku (aminokyseliny a amonné ionty)
- Provdzdušnění a přístup vzduchu během fermentace
- Úroveň turbidity moštu
- Typ odrůdy, ze které je mošt vyroben
- Délka macerace rmutu

Pokud vezmeme například obsah asimilovatelného dusíku, konkrétně aminokyselin, zjistíme, že deficiencie aminokyselin během fáze růstu kvasinek vede k jejich syntéze z α -ketokyselin, které vznikají derivací cukrů během glykolýzy. V případě nedostatečného množství dusíku pro tyto transaminační reakce dochází k přebytku α -ketokyselin, které jsou následně vylučovány (po dekarboxylaci a redukci) jako vyšší alkoholy – biosyntetická dráha. Naproti tomu v případě dostatečného množství aminokyselin (kdy kvasinka nemá potřebu aminokyseliny syntetizovat) dochází opět k přebytku α -ketokyselin a některé z nich jsou opět přeměněny na vyšší alkoholy a vyloučeny – Ehrlichova reakce. (Moreno-Arribas, Polo 2009)

Dalším zkoumaným faktorem, který ovlivňuje vznik vyšších alkoholů, je teplota. Například ve studii (Yilmaztekin M. 2013, [on-line] [cit. 2016-04-06]) je porovnáváno množství vytvořeného aktivního amyl alkoholu a isoamyl alkoholu v závislosti na teplotě 15°C a 25°C. Při nižší teplotě bylo naměřeno 19,2 mg l⁻¹ aktivního amyl

alkoholu a 12,4 mg l⁻¹ isoamyl alkoholu. Naproti tomu při teplotě 25°C bylo naměřeno 24,8 mg l⁻¹ aktivního amyl alkoholu a 24,9 mg l⁻¹ isoamyl alkoholu. Tyto hodnoty byly maximální při několika měřeních. Produkce amyl alkoholů byla tedy jednoznačně ovlivněna teplotou, a také bylo pozorováno, že změny teploty během fermentace vedly ke změnám výsledných hodnot, což vedlo k myšlence, že produkce amyl alkoholů je citlivá na změny teploty během fermentace. Naproti tomu nižší teplota a zvýšení tlaku CO₂ v médiu vedly ke snížení produkce vyšších alkoholů. Tyto pokusy byly prováděny s kvasinkami *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. Jak uvádí (Moreno-Arribas, Polo 2009), úroveň teploty zřejmě ovlivňuje aktivitu kvasinek a vyšší teplota má za následek jejich zvýšenou aktivitu a poptávku po výživě (dusíku) a následné navýšení produkce vyšších alkoholů.

Dalším důležitým faktorem pro vznik vyšších alkoholů je provzdušnění a celkově přístup vzduchu během fermentace. Obecně se má za to, že při určitých hladinách aerace dochází k vyšší produkci přiboudlinových alkoholů. Oproti tomu fermentace bez přístupu vzduchu vykazuje výrazně nízké hodnoty vyšších alkoholů. Ve studii (Yilmaztekin M. 2013, [on-line] [cit. 2016-04-06]) byly porovnávány mošty bez přístupu vzduchu a provzdušnění, poloprovzdušněné a výrazně provzdušněné mošty. Nejvyšší hodnoty amyl alkoholů byly dosaženy v poloprovzdušněné variantě, kdy se jednalo, v případě aktivního amyl alkoholu, o 92,8 mg l⁻¹ a u isoamyl alkoholu bylo dosaženo 43,8 mg l⁻¹. Nižších hodnot bylo dosaženo u výrazně provzdušněné varianty a nejnižší hodnoty vykázala varianta bez přístupu vzduchu a provzdušnění. Výše uvedené hodnoty byly naměřeny ve vrcholné fázi exponenciálního růstu. Poté následoval pokles ve stacionární fázi. Toto bylo vysvětlováno využitím vzniklých amyl alkoholů na reakci esterifikace a následný vznik isoamyl acetátu. Tyto pokusy byly prováděny s kvasinkami *Williopsis saturnus* var. *saturnus*. V pokusech bylo prokázáno, že určitý stupeň provzdušnění moštu vytváří až pětkrát vyšší hladiny vyšších alkoholů, než mošty fermentující za anaerobních podmínek.

Produkce vyšších alkoholů v alkoholických nápojích je tedy poměrně dobře ovlivnitelná. Na počátku je potřeba mít mošt, který obsahuje dostatečné množství cukrů pro výrobu energie, správné poměry dusíku, vhodného k tvorbě potřebných aminokyselin a další minerální látky potřebné k životu kvasinek. Ovlivnění tvorby vyšších alkoholů je pak do značné míry závislé na kmenu a druhu kvasinek a na fermentační kondici. Fermentační kondice se ovlivňuje jak kvalitou složení zdroje

dušiku, tak hlavně teplotou a aerací moštu při fermentaci. Tyto faktory poté způsobují stimulaci růstu kvasinek, jež má za následek, z prováděných pokusů potvrzenou, vyšší tvorbu vyšších alkoholů.

Naprosto zásadním faktorem při tvorbě vyšších alkoholů ve víně je kmen kvasinek. V této problematice jsou důležité jak jednotlivé kmeny, které mohou být použity k inokulaci moštu, tak jejich různé mixy, které vytvářejí celou řadu nových skutečností. Výzkumy druhů a kmenů kvasinek, ovlivňujících vznik různých volatilních komponentů vína, probíhají již od šedesátých let dvacátého století. Již v tomto období bylo prokázáno, že některé kmeny produkují vyšší množství alkoholů než jiné – například studie kvasinek kmenů Burgundsko, Jeréz, Montrachert. (Rankine 2006) zkoumal několik konkrétních kvasinek *Saccharomyces* a také několik přírodních druhů kvasinek a jejich vlivy na vznik vyšších alkoholů. Tato data zobrazuje: Obr. 15 Vznik vyšších alkoholů (mg l^{-1}) vlivem *Saccharomyces* kvasinek ve třech druzích moštu (Lambrechts, Pretorius, 2000)

Yeast	Pedro Ximinez pH 3.3			Tokay pH 3.3			Ugni blanc pH 3.42		
	<i>n</i> -PrOH	<i>i</i> -BuOH	AmOH*	<i>n</i> -PrOH	<i>i</i> -BuOH	AmOH	<i>n</i> -PrOH	<i>i</i> -BuOH	AmOH
<i>S. fructum</i>	20	11	140	107	9	142	52	8	145
<i>S. cerevisiae a</i>	16	23	95	41	14	126	21	15	125
<i>S. chevalieri</i>	12	39	207	26	30	256	10	34	280
<i>S. cerevisiae b</i>	56	21	151	170	9	151	92	9	264
<i>S. oviformis</i>	18	12	111	38	10	128	16	11	146
<i>S. cerevisiae c</i>	13	41	259	25	38	270	14	31	257
<i>S. cerevisiae d</i>	13	22	171	24	18	216	18	15	173
<i>S. bayanus</i>	9	30	166	19	35	249	11	26	195

* AmOH = iso + active amyl alcohol

Obr. 15 Vznik vyšších alkoholů (mg l^{-1}) vlivem *Saccharomyces* kvasinek ve třech druzích moštu (Lambrechts, Pretorius, 2000)

Výzkumy prokázaly, že při použití čistých kultur různých kmenů kvasinek *Saccharomyces* jsou koncentrace formovaných vyšších alkoholů výrazně rozdílné, a tedy vliv jednotlivých kmenů má zásadní význam. Naproti tomu při mixu čistých kultur *Saccharomyces* s kvasinkami vyskytujícími se na hroznech révy vinné (jejichž koncentrace byly ovšem nízké) nedochází k výrazným rozdílům v produkci vyšších alkoholů, oproti fermentaci čistými kulturami. V dalších pokusech (Giudici at al. 1990) srovnával produkce vyšších alkoholů u sta různých kmenů kvasinek. I tyto pokusy

prokázaly, že jednotlivé kmeny mají výrazně odlišné produkce vyšších alkoholů. Díky tomu mohou být členěny skupiny kmenů s vysokou produkcí vyšších alkoholů a kmeny s nízkou produkcí vyšších alkoholů. Toto rozdělení může mít význam pro komerční produkci kvasinek. Zajímavostí tohoto pokusu byla skutečnost, že vyšší produkce 1-propanolu souvisí s neschopností kvasinek produkovat H₂S, což může mít opět význam při komerční produkci různých kmenů kvasinek. (Lambrechts, Pretorius, 2000)

Další pokusy vlivu čistých a mixovaných kultur kmenů kvasinek na vznik volatilních látek (Herraiz *et al.* 1990) zahrnovaly kmeny *K.apiculata*, *T. delbrueckii* a *S. cerevisiae*. Výzkum spočíval v porovnání vín, kdy při fermentaci kvasinkami *K.apiculata*, *T. delbrueckii* a dodatečné inokulací *S. cerevisiae* vína bez takovéto inokulace vykazují výrazně odlišné složení volatilních látek oproti vínům, kdy inokulace *S. cerevisiae* proběhla na úplném počátku fermentace. Obecné závěry práce vykazovaly závislé poměry isoamyl alkoholu k aktivnímu amyl alkoholu a isobutanolu k propanolu. Výsledky také jasně prokázaly zásadní vliv apikulátních kvasinek na chemické složení výsledných vín a také na jejich kvalitu. Tyto pokusy byly dále rozvíjeny a výsledkem bylo zjištěno, že produkce vyšších alkoholů je až třikrát vyšší ve vínech fermentovaných mixem kvasinek *Saccharomyces* spp. a apikulátních kvasinek, oproti vínům fermentovaným čistými kulturami apikulátních kvasinek. Toto zobrazuje: Obr. 16 Koncentrace vyšších alkoholů produkovaných různými kvasinkami (Lambrechts, Pretorius, 2000)

	Pure culture wines*					Mixed culture wines ^b				
	A48	L22	T73	HAN	KLO	M1	M2	M3	M4	M5
Propanol	10.1	12.1	10.0	3.7	9.7	16.8	10.5	14.5	19.2	14.1
Isobutyl alcohol	62.0	44.7	35.5	9.8	18.0	72.4	68.9	78.7	60.0	87.6
Butanol	2.2	2.1	1.5	0.6	1.2	2.4	3.0	2.6	3.6	3.6
Isoamyl alcohol	166	182	202	29.5	44.7	247	220	253	209	235
Hexanol	2.2	2.3	2.4	2.5	2.4	2.3	2.3	2.4	2.4	2.2
Phenethyl alcohol	19.2	26.0	38.0	12.3	7.00	39.5	33.8	44.0	34.6	28.1
Total	261.7	269.2	289.4	58.4	83.0	380.4	338.5	395.2	328.8	370.6

^a A48 = *S. cerevisiae* A48 strain; L22 = *S. cerevisiae* L2226 strain; T73 = *S. bayanus* T73 strain; HAN = *Hanseniaspora uvarum*; KLO = *Kloeckera apiculata*.

^b M1 = 47.5% KLO + 47.5% HAN + 1% T73 + 4% A48; M2 = 47.5% KLO + 47.5% HAN + 1% T73 + 4% L22; M3 = 5% KLO + 5% HAN + 89% T73 + 1% A48; M4 = 5% KLO + 5% HAN + 5% T73 + 85% L22; M5 = 5% KLO + 5% HAN + 90% A48.

Obr. 16 Koncentrace vyšších alkoholů produkovaných různými kvasinkami (Lambrechts, Pretorius, 2000)

6 Metody stanovení vyšších alkoholů ve víně

Nejrozšířenější metodou zjišťování množství vyšších alkoholů ve víně je chromatografie. Chromatografie je separační a současně analytická fyzikálně chemická metoda pro separaci a analýzu směsí látek, jejímž základním principem je rozdělování složek směsi mezi mobilní a stacionární fázi. (Chromatografie, [on-line] [cit. 2016-04-17])

Chromatografické metody umožňují separaci jednotlivých komponentů zkoumané látky. Díky analytickému hledisku umí tyto metody zjistit nejenom jednotlivé komponenty ve zkoumané látce, ale také jejich množství, jedná se tedy o kvantitativní a kvalitativní analýzu. Chromatografické analýzy se zpravidla používají pro složité směsi látek, které mají navzájem dosti podobné chemické a fyzikální vlastnosti a které by se jinými metodami kvalitativně a kvantitativně analyzovaly jen velmi obtížně, pokud by to vůbec bylo možné. (Chromatografie, [on-line] [cit. 2016-04-17])

System rozdělení chromatografie uvádí: Tab. 3 Rozdělení chromatografie. (Chromatografie, [on-line] [cit. 2016-04-17])

Tab. 3 Rozdělení chromatografie. (Chromatografie, [on-line] [cit. 2016-04-17])

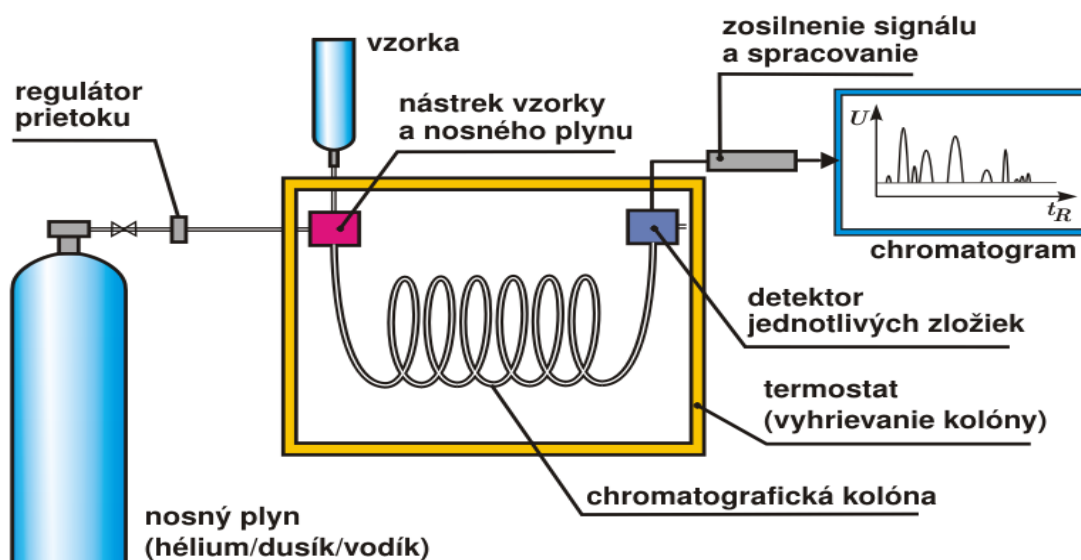
Rozdělení chromatografie				
Typ chromatografie	Mobilní fáze	Stacionární fáze	Název	Zkratka
Plynová chromatografie - GC - Gass chromatography	Plyn	Kapalina	Plynová rozdělovací chromatografie	GLC
		Pevná látka	Plynová adsorbční chromatografie	GSC
Kapalinová chromatografie - LC - Liquid chromatography	Kapalina	Kapalina	Kapalinová rozdělovací chromatografie	LLC
			Gelová permeační chromatografie	GPC
			Papírová chromatografie	PC
			Tenkovrstvá chromatografie	TLC
		Pevná látka	Kapalinová adsorbční chromatografie	LSC
			Iontově výměnná chromatografie	IEC
		Tenkovrstvá chromatografie	TLC	

Zásadním rozdělením u chromatografie je typ Mobilní fáze (jak je vidět z Tab. 3) V případě, že je mobilní fáze plynná, jedná se o plynovou chromatografii. Pokud je

mobilní fáze kapalná, jedná se kapalnou chromatografií. Mobilní fáze jako taková je ta, která se v systému chromatografie pohybuje. Stacionární fáze v chromatografii je pevnou částí a může to být pevná látka, nebo film kapaliny zakotvený na pevné látce.

6.1 Plynová chromatografie – GLC

Metoda plynová chromatografie se realizuje na přístroji Plynový chromatograf. Jako mobilní fáze se používá plyn a jako stacionární fáze se používá kapalina zakotvená na povrchu pevné látky. Plynový chromatograf zobrazuje: Obr. 17 Schématický náčrt plynového chromatografu (<https://sk.wikipedia.org>)



Obr. 17 Schématický náčrt plynového chromatografu (<https://sk.wikipedia.org>)

První podstatnou částí plynového chromatografu je nosný plyn, který slouží jako transportní médium pro analyzovanou látku. Má tu výhodu, že neinteraguje s analyzovanou látkou, ani se stacionární fází, čímž se plynový chromatograf liší od kapalného chromatografu. Jako nosný plyn se používají He, Ar, N₂, H₂, CO₂.

Nosný plyn se z tlakové láhve dostává dál přes regulátor průtoku, který zajišťuje konstantní průtokovou rychlost nebo tlak daného transportního média.

Další částí plynového chromatografu je nástřikový port. Toto místo slouží k vpravení analyzované látky na transportní médium. Analyzovaná látka může být ve formě plynné, nebo kapalně. Pokud se jedná o formu kapalnou, tak musí mít nástřikový port dostatečně vysokou teplotu, aby změnil skupenství analyzované látky z kapalně na

plynnou. V tomto místě tedy analyzovaná látka splyne s transportním médiem a je jím dále unášena. Nástříkový port může být buď ruční, nebo automatický.

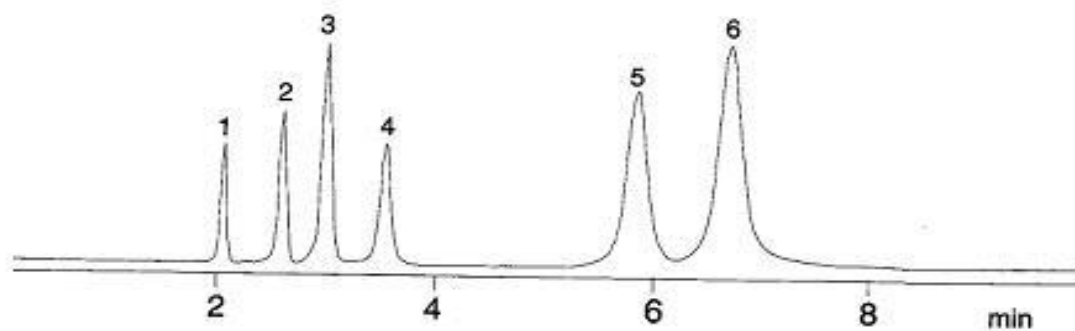
Další částí je kolona. Separační kolona je nejdůležitější částí plynového chromatografu. V současnosti se nejčastěji používají kapilární kolony. Kapilára je tvořena taveným křemenem, který je z vnější strany potažen filmem polymeru – ten má za úkol chránit kapiláru proti mechanickému poškození. Vnitřní strana kapiláry je potažena kapalinovým filtrem. Ten může být z různých látek, například: polyetylenglykoly, polypropylenglykoly, polyetylenglykoladipáty, metylpolysiloxany, tloušťka tohoto filmu bývá v rozmezí 0,2 až 0,25 μm . Délka samotné kapiláry bývá v rozmezí 10 – 100 m a průměr kapiláry se pohybuje v rozmezí 0,1 – 1 mm. Podstatným údajem je látka, ze které je tvořen vnitřní kapalinový film, protože na vlastnostech látky (polaritě) závisí, které látky bude možné analyzovat, tzn. rozdělovat na jednotlivé složky.

Po separační koloně následuje část detektor. Plynové chromatografy mohou mít různé typy detektorů. Volba detektoru závisí na způsobu aplikace a na cíli analýzy. Detektory se od sebe mohou lišit selektivitou citlivosti, mezí detekce. Mezi univerzální typy detektorů patří plamenově ionizační detektor (FID – flame ionization detector) s mezí detekce až 10^{-12} g ml^{-1} . Dalším významným typem je hmotnostní spektrometr, který má lepší mez detekce, až 10^{-13} g ml^{-1} , a navíc je možné jej používat přímo pro detekci látek.

Součástí plynového chromatografu je také termostat, který je schopen udržovat teplotu dle požadavku měření, tj. buď ji držet konstantně, nebo v závislosti na potřebě teplotu měnit.

Výsledkem měření na plynovém chromatografu je chromatogram. Obr. 18 Ukázka chromatogramu. (Chromatografie, [on-line] [cit. 2016-04-17]) Jedná se v podstatě o graf, kdy vodorovná osa zobrazuje čas a na svislé ose jsou zobrazeny jednotlivé píky. Píky se na ose x zobrazují v různých rozestupech – dle typu látky, kterou zobrazují. Jsou různě vysoké a mají různou plochu. V ideálním případě mají tvar Gaussovy křivky. Poloha píku na ose x uváděná pomocí retenčního času (určeno podle polohy vrcholu) určuje, o jakou látku se jedná (kvalitativní analýza), plocha píku (nebo jeho výška) určuje koncentraci látky ve směsi (kvantitativní analýza). Identifikace jednotlivých píků (tedy analyzovaných látek) se provede tak, že na stejné separační

koloně je analyzovaná látka, která je předem připravená, jedná se o tzv. standardní směs. Poté se jednotlivé píky porovnávají u obou analýz. Shodné látky se tedy shodují v umístění píků na vodorovné ose. (Chromatografie, [on-line] [cit. 2016-04-17])



Obr. 18 Ukázka chromatogramu. (Chromatografie, [on-line] [cit. 2016-04-17])

7 Shrnutí

Vznik vyšších alkoholů ve víně

Tato bakalářská práce měla za cíl prozkoumat vyšší alkoholy, mechanismus jejich vzniku a faktory, které tyto procesy ovlivňují. V práci je tedy obsažen seznam nejvýznamnějších vyšších alkoholů ve víně spolu s jejich fyzikálně chemickými vlastnostmi a vlivem na organoleptické vlastnosti vína.

Hlavní částí práce je ovšem vznik těchto alkoholů ve víně. Práce podrobně rozebírá obě cesty tvorby vyšších alkoholů. První cestou je katabolismus aminokyselin, známý pod termínem Ehrlichovy reakce, druhou cestou tvorby vyšších alkoholů je biosyntéza aminokyselin. Obě dvě cesty se protínají na bodě α -keto kyselin.

Podstatou k pochopení tvorby vyšších alkoholů je rozkrytí systému obou typů reakcí. Jedná se o enzymatické reakce, které jsou významně závislé na genech, které kódují tvorbu jednotlivých enzymů. Tedy, mimo genetickou výbavu jednotlivých kmenů kvasinek je pro vznik vyšších alkoholů důležité také zásobení moštu dusíkem – a jeho formy, aerace moštu, teplota fermentace a další faktory, které ovlivňují kondici fermentace.

Klíčová slova: vyšší alkoholy, Ehrlichovy reakce, biosyntéza aminokyselin, isoamyl alkohol, aktivní amyl alkohol, α -keto kyseliny.

Resume

The formation of higher alcohols in wine

The aim of this bachelor thesis is to investigate higher alcohols, mechanism of their formation and also factors, which have influence on formation processes. The presented thesis contains a list of the most significant higher alcohols present in wine together with their physical and chemical properties and their effect on organoleptic wine characteristics.

The main part of this thesis focuses on the origin of those higher alcohols in wine. Thesis analyses in detail both possibilities of higher alcohols formation. First possibility is represented by catabolism of amino acids, also known as the Ehrlich's pathways. Second possibility is represented by biosynthesis of amino acids. Both mentioned processes intersect at point of the α -keto acids.

For understanding the formation of higher alcohols is essential to reveal the system of both reaction types. The issue is that those enzymatic reactions are significantly dependent on genomes encrypting the formation of individual enzymes. For the formation of higher alcohols is important, except for the genetic equipment of yeast cell strains, to supply must with nitrogen. The condition of fermentation is then influenced by forms of nitrogen, must aeration, fermentation temperature and other factors

Keywords: higher alcohols; Ehrlich's pathways; biosynthesis of amino acids; isoamyl alcohol, active amyl alcohol; α -keto acids

8 Závěr

Vyšší alkoholy, jako zásadní volatilní látky ve víně, mají poměrně komplikovaný systém tvorby, a to hlavně ve vztahu k jejich vzniklému množství. Jednotlivé faktory a jejich kombinace dávají možnost vzniku velkých počtů výsledných kombinací vyšších alkoholů – jak druhy, tak jednotlivá množství. Vyšší alkoholy jako takové jsou pro víno pozitivní spíše v menším množství, kde přispívají hlavně ke komplexní chuti a případně k podpoře aromatu vína. Jejich vyšší objem ve víně je nežádoucí a vede k znehodnocení produktu. Zásadními faktory vzniku vyšších alkoholů je kmen kvasinek a jejich mix, obsah asimilovatelného dusíku v moštu, teplota, pH, aerace, odrůda Révy vinné.

Co se týká komerčního využití práce s vyššími alkoholy, tak výsledné poznatky opět spíše ukazují na nutnost obezřetnosti v množství vyšších alkoholů, které vzniká. Snaha o dosažení přiměřeného množství je dobře odhadnutelná při dodržení systémů práce s jednotlivými faktory, tj. práce s kmeny kvasinek a jejich mix, teplota fermentace, kdy příliš vysoké teploty, které podporují vznik vyšších alkoholů, jsou obecně pro víno nevhodné. Přístup vzduchu ke kvasicímu médiu také podporuje vznik vyšších alkoholů, ale obecně vysoký přístup vzduchu není pro období fermentace vhodný. Jak bylo uvedeno výše, zásadním faktorem je obsah a složení YAN, kdy předfermentační rozborů mohou významně ovlivnit nejen samotné víno jako celek, ale i zde je velmi důležitý vliv na tvorbu vyšších alkoholů. Složení YAN je také podstatné pro formu, kterou vyšší alkoholy vzniknou, tedy jestli budou tvořeny katabolismem nebo anabolismem aminokyselin. Ovšem pro výsledný vzniklý vyšší alkohol není typ dráhy podstatný.

Výsledkem je tedy skutečnost, že tvorba vyšších alkoholů je z enologického hlediska náročná disciplína, která vyžaduje cit a zkušenosti technologa, který se naučí pozorovat a poznávat jednotlivé kombinace faktorů ovlivňující vznik vyšších alkoholů ve vztahu k požadovanému výslednému produktu.

Seznam tabulek

Tab. 1 Vyšší alkoholy ve víně (Ribéreau-Gayon et al 2006 b ; Lambrechts, Pretorius, 2000).....	14
Tab. 2 Obecné dráhy biosyntézy aminokyselin (Ribéreau-Gayon et al 2006 a)	27
Tab. 3 Rozdělení chromatografie. (Chromatografie, [on-line] [cit. 2016-04-17])	36

Seznam obrázků

Obr. 1 Strukturální vzorec primárního alkoholu. (https://cs.wikipedia.org)	10
Obr. 2 Strukturální vzorec sekundárního alkoholu (https://cs.wikipedia.org).....	10
Obr. 3 Strukturální vzorec terciálního alkoholu (https://cs.wikipedia.org).....	10
Obr. 4 Ehrlichova reakce – obecná forma reakce. (<i>Key to diagnosing problem fermentations</i> [on-line] Davis : Univerzity of California. 2014).....	15
Obr. 5 Biosyntéza aminokyselin. (<i>Key to diagnosing problem fermentations</i> [on-line] Davis : Univerzity of California. 2014).....	15
Obr. 6 Teplotní mapa totožnosti genů (Hazelwood, at al, 2008).....	20
Obr. 7 Expresní profil pěti TPP dekarboxylačních genů. (Hazelwood, at al, 2008)	22
Obr. 8 Vznik glutamátu (Ribéreau-Gayon et al 2006 a).....	25
Obr. 9 Aminace glutamátu v glutaminové syntéze (Ribéreau-Gayon et al 2006 a)	26
Obr. 10 Biosyntéza aromatických aminokyselin (Gerhard B. H. 1991).....	28
Obr. 11 Šikimátová dráha v biosyntéze aromatických aminokyselin (Gerhard B. H. 1991).....	29
Obr. 12 Biosyntéza fenylalaninu a tyrosinu (Gerhard B. H. 1991)	30
Obr. 13 Biosyntéza tryptofanu (Gerhard B. H. 1991).....	30
Obr. 14 Vznik vyšších alkoholů - Ehrlichova reakce + Biosyntéza aminokyselin. (Moreno-Arribas, Polo 2009)	31
Obr. 15 Vznik vyšších alkoholů (mg l^{-1}) vlivem <i>Saccharomyces</i> kvasinek ve třech druzích moštu (Lambrechts, Pretorius, 2000).....	34
Obr. 16 Koncentrace vyšších alkoholů produkovaných různými kvasinkami (Lambrechts, Pretorius, 2000)	35
Obr. 17 Schématický náčrt plynového chromatografu (https://sk.wikipedia.org)	37
Obr. 18 Ukázka chromatogramu. (Chromatografie, [on-line] [cit. 2016-04-17])	39

9 Seznam použité literatury

- 1) Bartošová – Kabačová, Marie. *Kvasinka dvou tváří*, Vesmír : mikrobiologie [online] 04.1998, [cit. 2016-04-04], Dostupné z : <http://casopis.vesmir.cz/clanek/kvasinka-dvou-tvari>
- 2) EDER, Reinhard, a kol. *Vady vína*. V českém jazyce první vydání. Překlad Mgr. Milan Faltus,. Valtice : Národní vinařské centrum 2006, 268 s. ISBN 80-903201-6-3
- 3) GERHARD, Braus H. *Aromatic Amino Acid Biosynthesis in the Yeast *Saccharomyces Cerevisiae* : Model System for the Regulation of a Eukaryotic Biosynthetic Pathway*. Microbiological Reviews, 1991, str 349 – 370, 0146-0749/91/030349-22\$02.00/0, Dostupné z : <http://mibr.asm.org/content/55/3/349.full.pdf>
- 4) GIUDICI, Paolo et. al. *A biometric study of higher alcohol production in *Saccharomyces cerevisiae** [online]. *Canadian Journal of Microbiology* 1990, [cit. 2016-04-10] str. 61-64. DOI 10.1139/m90-012. Dostupné z : <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/m90-012#.Vxk6nmdf3wp>
- 5) HAZELWOOD, Lucie A. at al. *The Ehrlich Pathway for Fusel Alcohol Production: a Century of Research on *Saccharomyces cerevisiae* Metabolism*. Applied and Environmental Microbiology, 2008, str. 2259.2266, DOI: 10.1128/AEM.02625-07, Dostupné z : <http://aem.asm.org/content/74/8/2259.full>
- 6) HERRAIZ, Tomás. et al. *The Influence of the Yeast and Type of Culture on the Volatile Composition of Wines Fermented Without Sulfur Dioxide* [online] : American Society for Enology and Viticulture 1990 [cit. 2016-04-11] Dostupné z : <http://www.ajevonline.org/content/41/4/313.abstract>
- 7) Chromatografie – učební text. [online] Praha: 3. LF UK, 2013 [cit. 2016-04-11] Dostupné z : http://old.lf3.cuni.cz/chemie/cesky/materialy_B/chromatografie
- 8) *Key to diagnosing problem fermentations* [on-line] Davis : University of California. 2014, 18.08.2014. [cit. 2016-01-27] Dostupné z http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/fermentation_management/problem_key/amino_acid_derivatives.htm
- 9) MICHLOVSKÝ Miloš. *Lexikon chemického složení vína*. Rakvice : Vinselekt Michlovský a.s. a 2014. 262 s. ISBN 978-80-905319-2-5
- 10) MURLI, Dharmadhikari. *Nitrogen Metabolism During Fermentation* <https://www.extension.iastate.edu/wine/> [online].: Iowa State University - Midwest Grape and Wine Industry Institute, [cit.2016-03-25]. Dostupné z : <https://www.extension.iastate.edu/wine/sites/www.extension.iastate.edu/files/wine/NitrogenMetabolismDuringFermentation.pdf>
- 11) POLO,CM. –MORENO-ARRIBAS, V M. *Wine chemistry and biochemistry* 1. Vyd. New York : Springer, 2008. 735 s. ISBN 978-0-387-74116-1

- 12) RANKINE B.C. *Formation of higher alcohols by wine yeasts, and relationship to taste thresholds*, [online].: Science of Food and Agriculture, 2006, [cit. 2016-04-10] DOI: 10.1002/jsfa.2740181208 , Dostupné z : <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.2740181208/abstract>
- 13) RIBÉREAU – GAYON, Pascal, a. *Handbook of enology – Volume I. The Microbiology of Wine and Vinification 2nd edition*, New York : Johny Willey 2006 2 v. ISBN-10 0-470-01034-7
- 14) RIBÉREAU – GAYON, Pascal, b. *Handbook of enology – Volume II. The Chemistry of wine stabilization and treatments*, New York : Johny Willey 2006 2 v. ISBN 04-700-1037-1
- 15) Smyth, Heather Eunice *The Compositional basic of the aroma of Riesling and unwooded Chardonnay wine*, Adelaid 2005, The University of Adelaid – Faculty of Sciences. Dostupné z : <https://digital.library.adelaide.edu.au/dspace/bitstream/2440/56274/8/02whole.pdf>
- 16) VELÍŠEK Jan, HAJŠLOVÁ Jana, *Chemie potravin II. OSSIS – Ing. Václav Šedivý* 2009 644 s. ISBN 978-80-86659-16-9
- 17) YILMAZTEKIN, Murat et al. *Effects of Fermentation Temperature and Aeration on Production of Natural Isoamyl Acetate by Williopsis saturnus var. saturnus*, [online].: US National Library of Medicine National Institutes of Health, 2013, [cit. 2016-04-06]. Dostupné z : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3703881/>
- 18) ZDEŇKOVÁ Michaela, *Identifikace kvasinek rodu Saccharomyces během kvašení bílého vína*. Brno 2008. Diplomová práce. Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce Dana Vránová